

**EP 76279 and FR 2503714**

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

003547060

WPI Acc No: 1982-95055E/198244

**Mucopolysaccharide compsn. by controlled depolymerisation of heparin -  
uses nitrous acid, pref. generated in situ, which is totally consumed  
when desired polymerisation degree is attained**

Patent Assignee: SANOFI-SYNTHELABO (SNFI ); CHOAY SA (LCHO ); LORMEAU J C  
(LORM-I)

Inventor: CHOAY J; LORMEAU J; PETITOU M

Number of Countries: 016 Number of Patents: 012

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week	
WO 8203627	A	19821028				198244	B
FR 2503714	A	19821015				198247	
EP 76279	A	19830413	EP 82900970	A	19820409	198316	
JP 58500485	W	19830331				198319	
DK 8205474	A	19830509				198325	
EP 76279	B	19860917				198638	
DE 3273278	G	19861023				198644	
CA 1213276	A	19861028				198648	
IT 1150812	B	19861217				198847	
SU 1531859	A	19891223	SU 3527184	A	19821209	199028	
US 5019649	A	19910528	US 87111087	A	19871019	199124	
DK 173756	B	20010910	WO 82FR69	A	19820409	200157	
			DK 825474	A	19821209		

Priority Applications (No Type Date): FR 817283 A 19810410

Cited Patents: No-SR.Pub; 1.Jnl.Ref; FR 2478646; WO 8102737; WO 8103276

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 8203627	A	F 17		

Designated States (National): AU DK JP SU US

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB LU NL SE

EP 76279 A F

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

EP 76279 B F

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

DK 173756 B C08B-037/10 Previous Publ. patent DK 8205474

Abstract (Basic): WO 8203627 A

Prepn. of high purity, biologically active mucopolysaccharide (MPS) compsn. is effected by treatment of heparin with nitrous acid, or if pref. with reagents which generate nitrous acid in situ, using concentrations of reagents such that when the desired degree of polymerisation is attained then the nitrous acid, or reagents generating it, has been totally consumed. The reaction conditions other than the concn. of reagents are adjusted to obtain controlled depolymerisation of the heparin to give the desired MPS. When the reaction stops, the prods. are pptd. with an alcoholic solvent and recovered.

Compsns. produced by the above process are claimed, which are

practically free of contaminants, partic. nitrites and nitrates, and comprise above 98% of MPS having a mol.wt. of 2000-8000 daltons, which have an anti-Xa (Yin-Nessler or YW) activity of at least 200 w/mg, pref. above 250 u/mg and a USP or 13TT activity of less than 30 iu, pref. less than 20 iu or even 10 iu. The ratio of YW to USP or APTT is at least 3, pref. above 6 and especially above 10.

The compsns. control specific stages of the blood coagulation process. They have inhibitory active against factors X and Xa and are useful as antithrombotics with reduced risk of haemorrhage. They are generally administered orally.

Title Terms: MUCO; POLYSACCHARIDE; COMPOSITION; CONTROL; DEPOLYMERISE; HEPARIN; NITROUS; ACID; PREFER; GENERATE; SITU; TOTAL; CONSUME; POLYMERISE; DEGREE; ATTAIN

Index Terms/Additional Words: ANTITHROMBOTIC; HAEMORRHAGE

Derwent Class: A96; B04

International Patent Class (Main): C08B-037/10

International Patent Class (Additional): A61K-031/72; C08B-037/00;  
C08C-037/10

File Segment: CPI

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :  
(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

**2 503 714**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 81 07283**

---

(54) Procédé d'obtention de mucopolysaccharides biologiquement actifs, de pureté élevée, par dépolymérisation de l'héparine.

(51) Classification internationale (Int. Cl. 7). C 08 B 37/00; A 61 K 31/715.

(22) Date de dépôt..... 10 avril 1981.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée :

(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande..... B.O.P.I. — « Listes » n° 41 du 15-10-1982.

---

(71) Déposant : Société dite : CHOAY SA, résidant en France.

(72) Invention de : Jean-Claude Lormeau, Maurice Petitou et Jean Choay.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Plasseraud,  
84, rue d'Amsterdam, 75009 Paris.

"Procédé d'obtention de mucopolysaccharides biologiquement actifs, de pureté élevée, par dépolymérisation de l'héparine"

L'invention est relative à un nouveau procédé d'obtention de compositions de mucopolysaccharides de pureté élevée biologiquement actifs par dépolymérisation ménagée de l'héparine.

Elle concerne plus particulièrement un procédé du type en question permettant d'obtenir des mucopolysaccharides (ces produits seront désignés ci-après par l'abréviation MPS) capables notamment de contrôler, de manière hautement spécifique, certaines étapes de la coagulation sanguine et, en particulier, possédant une activité plus sélective que l'héparine vis-à-vis d'un nombre plus réduit de facteurs de la coagulation, notamment du facteur X activé ou facteur Xa du sang.

Compte-tenu de leurs propriétés, ces MPS constituent de précieux médicaments, notamment antithrombotiques. On conçoit alors l'intérêt, pour les applications thérapeutiques envisagées, de disposer de MPS de pureté élevée, en particulier pratiquement totalement débarassés de tous les contaminants que peut apporter le milieu de réaction, tout en n'ayant recours, pour leur obtention, qu'à des étapes opératoires de mise en oeuvre aisée dont le coût et la réalisation permettent une exploitation à l'échelle industrielle.

Pour l'obtention des composés de ce type, les inventeurs se sont plus spécialement intéressés à la dépolymérisation ménagée de l'héparine sous l'action d'un agent chimique capable de fragmenter les chaînes qui la constituent, en particulier de l'acide nitreux.

Or, d'une manière générale, les procédés de ce type, proposés à ce jour, conduisent à des mélanges de dépolymérisation renfermant de nombreux contaminants, notamment des nitrites et des nitrates provenant de l'acide nitreux n'ayant pas réagi. Il s'avère alors nécessaire de purifier avec soin, au cours d'étapes supplémentaires, les compositions de MPS de ces mélanges avant de les utiliser en thérapeutique.

En outre, la réalisation de la réaction jusqu'au degré de dépolymérisation souhaité exige un contrôle rigoureux de la progression de la dépolymérisation afin d'arrêter cette dernière pour empêcher une dépolymérisation plus poussée.

La recherche par les inventeurs de moyens permettant d'obtenir les MPS recherchés, de manière plus satisfaisante, les a conduits à étudier des conditions de réalisation de la dépolymérisation partielle de l'héparine dans des conditions différentes.

Les travaux effectués ont permis de constater qu'en choisissant l'un des paramètres et en le faisant varier de manière appropriée, en fonction de la qualité du produit souhaité, il était possible d'obtenir un mélange de dépolymérisation pratiquement exempt de contaminants du type nitrite-nitrate et d'éviter durant la réaction le contrôle de la dépolymérisation pour arrêter cette dernière lorsque le degré souhaité est atteint.

L'invention a donc pour but de fournir un nouveau procédé permettant d'obtenir des MPS possédant les propriétés biologiques évoquées ci-dessus tout en étant pratiquement exempts de tous contaminants tels que nitrites et nitrates, qui se trouvent donc par là sous forme particulièrement appropriée pour leurs applications en thérapeutique.

Elle a également pour but de fournir un procédé permettant d'obtenir ces MPS sans avoir à exercer un contrôle rigoureux de la durée de réaction pour arrêter cette dernière dès que le degré de dépolymérisation souhaité est atteint, le degré de dépolymérisation étant ajusté à volonté.

Elle vise également à fournir un procédé dont la mise en oeuvre à l'échelle industrielle est rendue extrêmement aisée en raison des conditions particulières choisies pour la dépolymérisation ménagée de l'héparine.

Le procédé d'obtention de compositions de MPS biologiquement actifs selon l'invention est caractérisé par le fait qu'on met en oeuvre l'héparine et l'acide nitreux

ou, de manière préférée, les réactifs utilisés pour l'engendrer in situ, selon des quantités telles que lorsque le degré de dépolymérisation souhaité est atteint, l'acide nitreux, le cas échéant, les réactifs utilisés pour le générer in situ, soit totalement consommé, les conditions de la réaction autres que les concentrations en réactifs étant avantageusement ajustées les unes en fonction des autres de manière à permettre l'obtention d'une dépolymérisation partielle de l'héparine de départ conduisant aux MPS recherchés et, après arrêt par elle-même de la réaction, on sépare les MPS qui sont précipitables par un solvant alcoolique et on les récupère.

L'intérêt de ces dispositions s'avère particulièrement précieux au regard des applications biologiques envisagées pour les produits. En effet, les compositions de MPS récupérées du mélange de dépolymérisation sont pratiquement totalement exemptes de produits toxiques, en particulier de nitrites et de nitrates, la formation de ces dérivés n'ayant pu se produire étant donné la consommation totale de l'acide nitreux et l'élimination sous forme gazeuse de ceux contenant de l'azote, ce qui permet d'éviter toute contamination après la réaction du produit formé par des composés nitrés toxiques.

Ce procédé présente, en outre, un avantage considérable au niveau de la technique de réalisation.

En effet, grâce aux dispositions utilisées, la réaction de dépolymérisation en quelque sorte "s'autorégule", s'arrêtant d'elle-même lorsque le degré de dépolymérisation voulu est obtenu.

On se libère ainsi de la contrainte de la durée des réactions qui est rendue nécessaire dans les techniques antérieures afin d'éviter une dépolymérisation trop avancée de l'héparine.

Conformément à l'invention, au lieu de se conformer à la cinétique de réaction découlant des paramètres utilisés jusqu'alors et, notamment, des quantités de réactifs, on choisit la concentration en produits engendrant l'acide

nitreux de manière à obtenir la dépolymérisation recherchée afin que la dépolymérisation s'arrête du fait de la disparition par consommation totale de l'un des réactifs lorsque les produits souhaités sont obtenus.

5 La quantité d'acide nitreux mise en oeuvre, ou de produits utilisés pour l'engendrer in situ, doit être suffisante pour obtenir un rendement satisfaisant en produits de dépolymérisation, de la qualité souhaitée mais ne doit pas dépasser une limite au-delà de laquelle, compte-tenu de  
10 la quantité d'héparine mise en oeuvre, l'acide nitreux ne serait pas entièrement consommé.

De manière préférée, les conditions mises oeuvre sont choisies de manière à obtenir un rendement quantitatif en unités Yin-Wessler.

15 D'une manière avantageuse, on met ainsi en oeuvre de 0,03M à 0,07M, notamment de 0,03M à 0,05M de  $\text{NaNO}_2$  avec de l'héparine à 10% environ.

Les dispositions ci-dessus sont avantageusement mises en oeuvre dans un procédé de dépolymérisation ménagée d'héparine dans lequel, les conditions de la réaction autres  
20 que les quantités de réactifs, permettent plus spécialement l'obtention de MPS ayant une activité anti-Xa (Yin-Wessler) d'au moins 200 u/mg, un rapport de leur titre Y-W/USP ou de leur titre YW/APTT d'au moins 2, formés d'une majeure partie d'espèces ayant un poids moléculaire de 2000 à 8000 daltons.  
25

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, on met avantageusement en oeuvre comme matière première une héparine possédant un poids moléculaire de 2000 à 50 000 environ.  
30

peut s'agir d'une héparine de qualité pharmaceutique classique, injectable, ou d'une héparine brute telle qu'elle est obtenue à l'issue des opérations d'extraction de ce principe actif à partir de tissus ou d'organes de mammifères,  
35 notamment de mucus d'intestins ou de poumons, par exemple de porc ou de boeuf. Elle peut encore être constituée par

les produits qui sont normalement écartés lors de la purification d'une héparine en vue de l'obtention d'une héparine de qualité injectable et d'activité spécifique plus élevée.

5 L'héparine mise en oeuvre est soumise, dans des conditions ménagées, à l'action d'un agent chimique, plus particulièrement de l'acide nitreux. Cet acide peut être ajouté à l'héparine ou formé in situ par addition, selon des quantités contrôlées, d'un acide, à un dérivé de  
10 l'acide nitreux, en particulier, un sel éther-sel, plus spécialement un sel alcalin ou alcalino-terreux.

Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise comme sel de l'acide nitreux, du nitrite de sodium  $\text{NaNO}_2$ .

15 Pour engendrer in situ l'acide nitreux, on ajoute des quantités contrôlées d'un acide comportant des anions biologiquement acceptables tels que l'acide acétique et plus spécialement l'acide chlorhydrique.

20 L'action de l'acide nitreux sur l'héparine est effectuée en milieu aqueux.

Conformément à l'invention, les concentrations en héparine et en acide nitreux sont choisies de manière telle que lorsque le degré de dépolymérisation souhaité est atteint, l'acide nitreux soit totalement consommé, les autres para-  
25 mètres intervenant pour la réalisation de cette réaction, en particulier la température et le pH étant ajustés les uns aux autres afin d'obtenir les produits désirés dans les conditions expérimentales les plus satisfaisantes.

L'étude de ces conditions expérimentales par les in-  
30 venteurs a montré qu'il est avantageux de mettre en oeuvre l'héparine et les produits engendrant l'acide nitreux selon des quantités conduisant à une concentration finale en héparine d'au moins 8%, avantageusement de l'ordre de 8 à 12%, spécialement voisine de 10%, la concentration finale en ni-  
35 trite de sodium étant alors de 0,02M à 0,1M environ et de préférence de 0,05M. Compte-tenu des concentrations élevées



en héparine, les volumes à manipuler pour la mise en oeuvre du procédé d'autorégulation selon l'invention, sont considérablement réduits, d'un facteur d'au moins 5, par rapport aux techniques chimiques habituelles.

- 5 Les essais réalisés ont montré qu'il était approprié de recourir à une température de l'ordre de 0 à 10°C, de préférence voisine de 4°C.

Comme déjà souligné, ces conditions permettent de se libérer d'un contrôle rigoureux de la durée de la réaction.

- 10 Les conditions mises en oeuvre sont telles qu'elles permettent une autorégulation de la réaction de dépolymérisation partielle, selon un principe qui se distingue de celui mis en oeuvre dans les procédés connus, ce qui se traduit par une différence au niveau des résultats, à savoir  
15 l'absence de nitrite dans le milieu réactionnel en fin de réaction, les composés azotés formés étant volatils.

- Lorsque l'acide nitreux mis en oeuvre est épuisé, le degré de dépolymérisation souhaité est atteint et on précipite du milieu de dépolymérisation ceux des produits qui sont  
20 précipitables par l'alcool. Auparavant, on réajuste avantageusement le pH à une valeur voisine de la neutralité.

- Pour l'opération de précipitation, on a avantageusement recours à de l'éthanol absolu. Les essais effectués ont permis de constater qu'en utilisant environ 2 volumes  
25 d'éthanol, on obtenait la précipitation souhaitée des MPS biologiquement actifs.

Le précipité formé est récupéré et, en vue de son utilisation, lavé et séché.

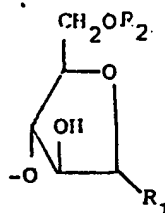
- La mise en oeuvre des dispositions qui précèdent permet  
30 d'obtenir des produits caractérisés notamment par les points suivants.

- Ces produits sont solubles dans un milieu hydro-alcoolique (eau-éthanol), ayant un titre de 55-61°GL, de préférence de 58°GL ; ils tendent vers l'insolubilité dans un milieu  
35 eau-éthanol dont la teneur en alcool est plus élevée ; ils sont insolubles dans l'alcool pur ; ils présentent des

titres Y-W d'au moins 200 u/mg, et des rapports de titre Y-W/USP d'au moins 2, notamment d'au moins 3, de préférence d'au moins supérieur à 6, voire à 10 ; ils comportent des motifs terminaux possédant la structure de base 2,5-anhydro-D-manno dont la fonction alcool-primaire en 6 est substituée ou non par un groupe  $-\text{SO}_3^-$ .

Ce motif terminal répond à la formule suivante :

10



15

où  $R_1$  représente un groupement fonctionnel choisi notamment parmi des groupements aldéhyde, alcool ou acide carboxylique ou leurs dérivés, notamment les acétals, amides, éthers, esters ou sels correspondants et  $R_2$  un atome d'hydrogène ou un groupe  $\text{SO}_3^-$ .

Dans un aspect avantageux de l'invention,  $R_1$  est constitué par un groupe aldéhyde, acide carboxylique ou alcool.

20

De préférence encore, les produits obtenus selon l'invention sont constitués par une majeure partie d'espèces de poids moléculaire de 2000 à 8000 daltons environ, ce qui correspond à des structures ayant de 8 à 40 entités saccharidiques.

25

Tels qu'ils sont obtenus, ces produits sont dépourvus de nitrates-nitrites contaminants.

30

D'une manière générale, ces produits sont particulièrement précieux, en raison de leurs propriétés pharmacologiques de grand intérêt. Ils possèdent, en effet, une activité anti-Xa YW au moins égale à celle de l'héparine de départ alors que leur titre USP ou APTT (qui traduit l'activité anticoagulante globale) est inférieur à celui de l'héparine, ce qui facilite leur utilisation et

diminue les risques d'accidents hémorragiques.

De plus, leur faible poids moléculaire par rapport à celui de l'héparine de départ leur confère une pharmacocinétique retardée d'un grand intérêt en thérapeutique.

5 Ils peuvent en outre être avantageusement utilisés par voie orale.

A titre illustratif, on indique ci-après un exemple de réalisation du procédé de l'invention.

10 EXEMPLE 1 : Dépolymérisation auto-régulée de l'héparine et obtention de MPS de bas poids moléculaire -

Dans 15 litres d'eau distillée à +4°C, on dissout 1500 grammes d'héparine commerciale ayant un rapport YW/USP voisin de 1 et un titre USP de 160 ui. On ajoute 51,8 g de nitrite de sodium dissous dans 300 ml d'eau distillée, et immédiatement le pH est abaissé à 2,5 par de l'acide chlorhydrique pur.

La réaction s'opère alors. Au bout de 40 minutes, on détermine la présence ou l'absence d'ions nitreux dans le milieu réactionnel à l'aide de papier iodoamidonné, toutes les 5 minutes. Au bout d'environ 60 minutes de réaction, l'acide nitreux a été entièrement consommé et il ne subsiste plus d'ions  $\text{NO}_2^-$  dans le milieu réactionnel. Le pH est alors ajusté à 7 par de la soude pure, et les produits de la réaction sont récupérés par addition de 31 litres d'éthanol pur (2 volumes).

Le précipité formé est collecté par centrifugation, lavé à l'éthanol et séché à 60°C sous vide.

On recueille des produits présentant les caractéristiques suivantes :

30	Titre USP.....	19 ui/mg
	Titre APTT *.....	13 ui/mg
	Titre Yin et Wessler.....	202 u/mg
	Teneur en nitrites/nitrates	4 ppm

\* abréviation des termes anglais "activated partial thromboplastin time, (équivalent du temps de Cephaline kaolin Caen J et al. l'hémostase, édit. Expansion Scientifique

1976, p. 169-170).

EXEMPLE 2 -

En procédant comme dans l'exemple 1, en partant d'une solution d'héparine à 10% (100 g/l), on obtient des MPS présentant les rapports YW/USP selon la quantité de  $\text{NaNO}_2$  mise en oeuvre, à savoir :

$\text{NaNO}_2$	Rapport des titres YW et USP des MPS	
0,03M	2,7	(140/51)
0,04M	8	(214/26)
0,05M	12	(230/19)
0,06M	16	(194/12)
0,07M	22	(201/9)
0,08M	19	(132/6,4)
0,1M	44	(110/2)

Des MPS préférés correspondent à ceux obtenus en utilisant de 0,03 à 0,07M, notamment de 0,03 à 0,05M.

REVENDICATION

- Procédé d'obtention de compositions de mucopolysaccharides, ou MPS, biologiquement actifs, de pureté élevée, caractérisé par le fait qu'on met en oeuvre l'héparine et
- 5 l'acide nitreux, ou, de manière préférée, les réactifs utilisés pour l'engendrer in situ, selon des quantités telles que lorsque le degré de dépolymérisation souhaité est atteint, l'acide nitreux, le cas échéant les réactifs utilisés pour le générer in situ, soit totalement consommé, les
- 10 conditions de la réaction autres que les concentrations en réactifs étant avantageusement ajustées les unes en fonction des autres de manière à permettre l'obtention d'une dépolymérisation partielle de l'héparine de départ conduisant aux MPS recherchés et, après arrêt par elle-même de la
- 15 réaction, on sépare les MPS qui sont précipitables par un solvant alcoolique et on les récupère.